

IDENTIFIKASI DAN UJI BIOAKTIVITAS LUPEOL DAN MARMIN YANG DIPISAHKAN DARI KORTEKS *Aegle marmelos*

Sugeng Riyanto*, Mohd. Aspollah Sukari**,
Mawardi Rahmani**, Abd. Manaf Ali***

INTISARI

Riyanto, S., M.A. Sukari, M. Rahmani, A.M. Ali. 2001. Identifikasi dan uji bioaktivitas lupeol dan marmin yang dipisahkan dari korteks *Aegle marmelos*. *Biologi* 2 (11): 685-692.

Aegle marmelos Corr.(Rutaceae) mempunyai nama daerah *Maja* (Jawa), digunakan sebagai tanaman obat tradisional. Pada penelitian sebelumnya korteks *Aegle marmelos* Corr. diekstraksi dengan pelarut petroleum eter, sehingga diperoleh senyawa triterpen dan campuran stigmasterol dan sitosterol.

Pada penelitian ini serbuk kering korteks *Maja* yang telah diekstraksi dengan petroleum eter diekstraksi kembali dengan pelarut kloroform. Senyawa yang terkandung di dalam ekstrak kloroform dipisahkan dengan metode kolom kromatografi vakum dan dilanjutkan dengan kolom kromatografi graviti. Struktur molekul senyawa yang diperoleh ditentukan dengan spektroskopi UV,IR, Massa dan RMI 2-Dimensi. Uji bioktivitas dilakukan dengan uji antimikroba dan sitotoksik.

Dengan metode pemisahan diatas maka dapat dipisahkan lupeol dan senyawa turunan kumarin yaitu marmin. Hasil uji antimikroba menunjukkan bahwa ekstrak kloroform menghambat lemah pertumbuhan *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada media agar. Sedangkan uji sitotoksik lupeol memberikan $IC_{50} > 3\text{mg/ml}$ dan marmin memberikan $IC_{50} > 10\text{mg/ml}$.

Kata kunci : lupeol, marmin, uji bioaktivitas, korteks *Aegle marmelos*

* Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

** Department of Chemistry, Universiti Putra Malaysia

*** Department of Biotechnology, Universiti Putra Malaysia

ABSTRACT

Riyanto, S., M.A. Sukari, M. Rahmani, A.M. Ali. 2001. Identification and bioactivity test of isolated lupeol and marmin from *Aegle marmelos* bark. *Biologi* 2 (11):

Aegle marmelos Corr. (Rutaceae) has a local name *Maja* (Java). The plant is used in traditional medicine treatment. In the previous study, *Aegle marmelos* Corr. bark was extracted using petroleum eter, triterpenes and mixture of stigmasterol and sitosterol were obtained. Therefore, the objective of this study is to isolate the other compounds from the bark using chloroform and examine their bioactivity.

In the present study, the dry powder of *Maja* bark that had been extracted with petroleum ether was further extracted using chloroform. The chloroform crude extract obtained was subjected to the vacuum column and continued by gravity column chromatography. The molecular structure of the isolated compounds were determined by the spectral data of UV, IR, Mass and 2D NMR. Antimicrobial activity and cytotoxic test were used to examine the bioactivity of the substances.

The applied method of isolation provided lupeol and marmin. The bioactivity tests shown that chloroform crude extract inhibited the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus* in agarous media weakly. While cytotoxic tests showed that IC_{50} of lupeol > 3 µg/ml and marmin > 10 µg/ml.

Key words : lupeol, marmin, bioactivity test, *Aegle marmelos* bark

PENDAHULUAN

Tumbuhan *Maja* (*Aegle marmelos* Corr.) ini digunakan sebagai obat tradisional, yaitu untuk mengobati disentri, penyakit jantung dan juga untuk obat anti hamil (Heyne, 1987). Dilaporkan di pulau Flores, *Maja* digunakan untuk mengobati diabetes (Ohashi, dkk., 1994). Pada penelitian sebelumnya kulit batang *Aegle marmelos* Corr. diekstraksi dengan petroleum eter. Senyawa yang berhasil dipisahkan adalah: lupenon, lupeol, dan fitosterol (Riyanto, dkk., 2000).

Pada penelitian ini senyawa yang terkandung di dalam ekstrak kloroform kulit batang (korteks) *Aegle marmelos* Corr. diisolasi dengan metode kromatografi. Dari hasil analisis spektroskopi ternyata senyawa tersebut adalah turunan triterpen dan kumarin.

METODOLOGI

Bahan

Korteks segar yang dipisahkan dari batang *Aegle marmelos*

Corr. yang tumbuh di Godean, Yogyakarta.

Alat

Titik lebur senyawa diperiksa dengan alat *hot plate* (Thomas). Spektra Ultra Violet (UV) dibuat pada spektrofotometer JEOL. Sedangkan spektra infra merah (IR) direkam dengan spektrometer FTIR dari Perkin Elmer model BX. Spektra Resonansi Magnit Inti proton ($RMI-^1H$) direkam pada spektrometer RMI JEOL 500 MHz dengan TMS sebagai standar internal dan $CDCl_3$ sebagai pelarut, sedangkan $RMI-^{13}C$ direkam pada 125 MHz. Spektra massa (MS) dibuat pada spektrometer AEI-MS 12. Vakum kolom kromatografi menggunakan fase diam silica gel 60 Merck PF₂₅₄ seri 1.07749, sedangkan untuk kolom kromatografi graviti digunakan silica gel 60 Merck 1.07734. Digunakan kromatografi lapis tipis buatan Merck dengan spesifikasi silica gel GF₂₅₄ seri 1.05735.

Jalannya Penelitian

Korteks yang telah dikeringkan pada suhu kamar dibuat serbuk, direndam ke dalam petroleum eter sehingga senyawa non polar terlarut dan dipisahkan.

Kemudian serbuk tersebut direndam dalam kloroform selama 24 jam, filtrat yang diperoleh dikumpulkan dengan filtrat berikutnya hasil ulangan rendaman ke dua dan ke tiga. Filtrat diuapkan pelarutnya menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kloroform dari korteks *Aegle marmelos*. Teknik kromatografi pertama yang dikerjakan adalah vakum kolom kromatografi. Kepada fraksi atau hasil pemisahan yang diperoleh dapat dilanjutkan pemisahan menggunakan kolom kromatografi graviti. Elusi dimulai dengan pelarut non polar kemudian diikuti dengan pelarut yang polaritasnya meningkat secara bertahap (*gradient elution*). Kromatografi lapis tipis digunakan untuk mengetahui kemurnian senyawa yang dipisahkan, selain itu kemurnian juga diuji dengan melihat ketajaman titik lebur. Struktur molekul ditentukan dengan menginterpretasi data spektroskopi UV, IR, MS $RMI-^1H$ dan ^{13}C .

Uji antimikroba dilakukan dengan metode difusi pada media agar padat. Sampel diimpregnasi pada piring-kertas saring.

Mikroba yang digunakan: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*

nosa, *Aspergillus ochraceus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *Saccharomyces lipolytica*.

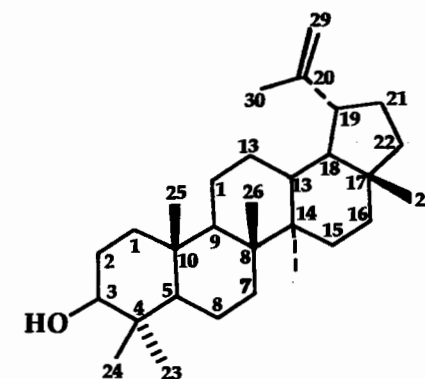
Setelah diinkubasi 24 jam diperiksa garis tengah daerah inhibisi. Sel kanker T-lymphoblastic leukemia digunakan pada uji sitotoksik. Sel ini ditanam dalam 96 sumuran pada media pertumbuhan, masing-masing sumuran diletakkan $1-2 \times 10^4$ sel, dicampur dengan 100 μ l sampel dengan bervariasi kadar. IC_{50} digunakan sebagai indeks sitotoksik, yaitu kadar sample yang dapat memberikan hambatan sebanyak 50% pertumbuhan sel kanker. Pembenu-

tukan warna menggunakan garam tetrazolium. Sel dihitung dengan membandingkan besarnya absorbansi sumuran berisi sampel dengan absorbansi sumuran kontrol, dibaca pada λ 574 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

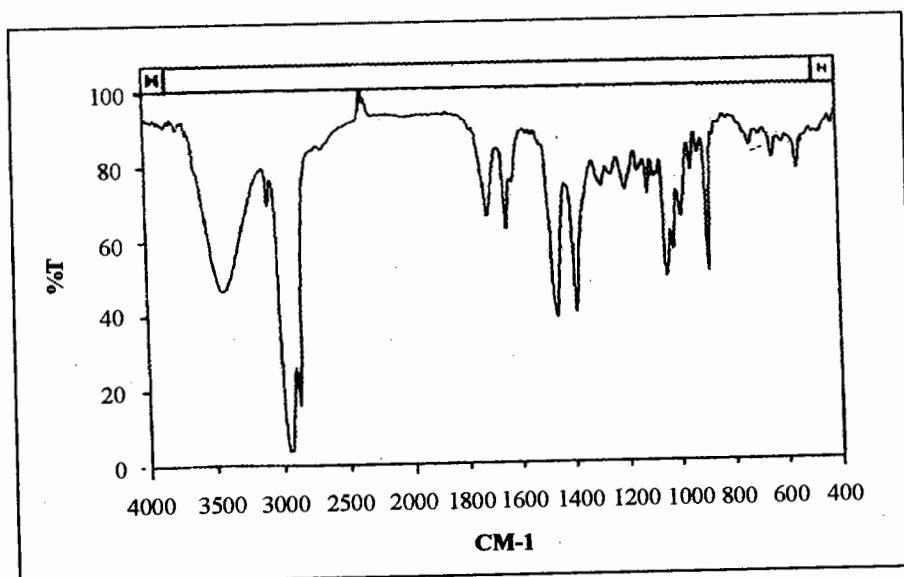
Senyawa 1 berbentuk serbuk putih, mempunyai titik lebur 202-204°C (rekristalisasi dengan aseton), menurut pustaka untuk bentuk amorph mempunyai titik lebur 202,5°C (Buckingham, 1994). Spektrum massa menunjukkan M^+ pada 426, Hal ini sesuai dengan berat molekul dari $C_{30}H_{50}O_1$.

Spektrum IR menunjukkan : Puncak melebar pada bilangan gelombang 3412 cm^{-1} , yang merupakan signal adanya gugus OH terikat. Puncak pada 3071 cm^{-1} adalah signal dari C-H aromatik atau C-H yang terikat pada C=C. Puncak 2938 cm^{-1} adalah signal dari C-H jenuh, dan puncak $1456, 1382\text{ cm}^{-1}$ adalah signal adanya gugus fungsional C=C. Spektrum IR senyawa 1 dapat dilihat pada gambar 1. Pada spektrum ini tidak ada puncak kuat pada sekitar bilangan gelombang 1715 nm, hal ini menunjukkan tidak adanya gugus fungsional C=O pada senyawa 1. (Lupenon adalah senyawa dengan kerangka karbon sama seperti lupeol tetapi mempunyai gugus C=O pada C-3). Dengan menginterpretasi data spektroskopi diatas dan membandingkan dengan R_f dan titik lebur senyawa lupeol pembandingan, maka disimpulkan bahwa, senyawa 1 adalah 20(29)-lupen-3-ol atau lupeol. (R_f lupeol = 0,5 dalam heksan : kloroform = 1:9). Struktur kimia lupeol terlihat pada gambar 2. Data RMI ^1H dan ^{13}C senyawa 1 telah dilaporkan Riyanto, dkk.(2000) yaitu pada waktu melaporkan adanya lupeol dalam ekstrak petroleum eter korteks *Aegle marmelos*.



Gambar 2, Lupeol

Senyawa 2 berbentuk kristal putih, mempunyai titik lebur pada 126-128°C, sedangkan pada kepustakaan 123-124°C (Buckingham dkk., 1994). Kromatografi lapis tipis memberikan harga $R_f=0,6$ (metanol: kloroform = 1:9). Spektrum UV dalam metanol menunjukkan λ maksimal berurutan 324 nm dengan $\log \epsilon = 4,21$; 220 nm dengan $\log \epsilon = 4,11$ dan 205 nm dengan $\log \epsilon = 4,62$. Spektrum ini karakteristik seperti yang ditunjukkan oleh senyawa turunan kumarin. Spektrum infra merah menunjukkan adanya : gugus OH yaitu adanya serapan pada 3764 dan 3360 cm^{-1} , C-H aromatik pada 3066 cm^{-1} dan C-H alifatik pada 2980 cm^{-1} . Gugus fungsi C=O muncul pada 1717 cm^{-1} dan C=C memberikan serapan pada 1614 cm^{-1} . Spektrum massa menun-



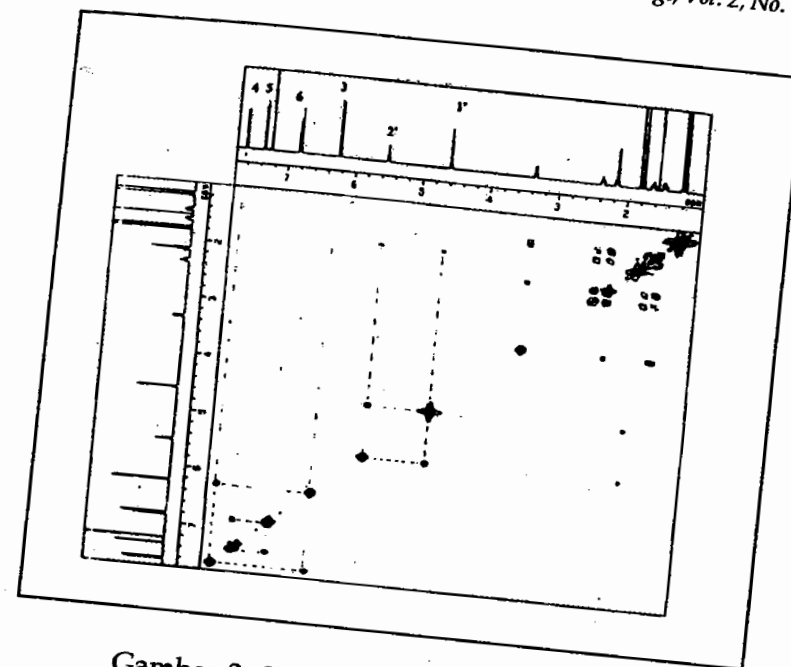
Gambar 1. Spektrum IR senyawa 1.

jukkan M^+ pada m/z 332, hal ini sesuai dengan $C_{19}H_{24}O_5$. Puncak dasar ion fragmen terdapat pada m/z 162, adalah massa dari inti kumarin (Rashid dkk,1992). Spektrum RMI-proton menunjukkan adanya tiga puncak (singlet) dari gugus metil ($3'',8',9'$) pada δ 1,17; 1,21 dan δ 1,78. Dua proton bertetangga pada cincin piron (C-3,C-4) ditunjukkan adanya dublet pada δ 6,24 dan δ 7,63 ($J=9,5\text{Hz}$). Dua dublet lain pada δ 7,36 dan δ 6,85 ($J=8,5\text{Hz}$) adalah signal dari

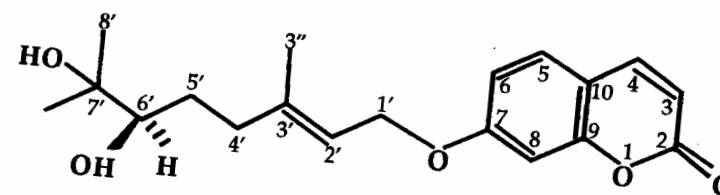
dua proton bertetangga pada cincin benzen (C-5 dan C-6). Spektrum COSY (H-H correlation spectroscopy) pada gambar 3, menyakinkan adanya kedua coupling tersebut, dan juga dapat menunjukkan adanya coupling antara dua proton yang masing-masing terikat pada C-1' dan C-2'. Spektrum RMI- ^{13}C menunjukkan adanya 19 atom C, satu diantaranya adalah puncak C karbonil yang terletak pada δ 162 dan 3 atom C metil terletak sekitar δ

Tabel 1. Data resonansi magnet inti senyawa 2

C	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	COSY	HMQC	HMBC
1	-	-	-	-	-
2	-	162,0	-	-	H ₃
3	6,24 d.J=9,5	113,0	H ₄	H ₃	H ₄
4	7,63 d.J=9,5	143,4	H ₃	H ₄	H ₅
5	7,36 d.J=8,5	128,7	H ₆	H ₅	H ₄
6	6,85 dd.J=8,5, 2,4	113,3	H ₅	H ₆	H ₆ , H ₅
7	-	161,3	-	-	H ₆ , H ₈
8	6,82 d.J=2,4	101,6	-	H ₈	H ₆
9	-	155,8	-	-	H ₈
10	-	112,5	-	-	H ₄ , H ₃ , H ₅
1'	4,60 d.J=6,7	65,4	H _{2'}	H _{1'}	H _{2'}
2'	5,52 dd.J=5,5	118,9	H _{1'}	H _{2'}	H _{1'} , H _{3''} , H _{4'}
3'	-	142,2	-	-	H _{4'} , H _{3''} , H _{2'}
4'	2,16 m.	36,5	H _{5'}	H _{4'}	H _{5'}
5'	1,49 m.	29,4	H _{4'} , H _{6'}	H _{5'}	H _{4'}
6'	3,36 m.	78,0	H _{5'}	H _{6'}	H _{9'} , H _{5'}
7'	-	73,0	-	-	H _{8'} , H _{9'}
8'	1,21 s.	26,5	-	H _{8'}	H _{9'} , H _{3''}
9'	1,71 s.	23,2	-	H _{9'}	H _{8'} , H _{3''}
3''	1,78 s.	16,8	-	H _{3''}	H _{2'} , H _{4'}



Gambar 3. Spektrum COSY senyawa 2



Gambar 4. Marmin

20,1. Ringkasan data RMI senyawa 2 disajikan pada Tabel 1.

Dengan menginterpretasikan data spektroskopi yang diperoleh dan dibandingkan dengan data yang dilaporkan sebelumnya (Wilzer dkk.1989), maka senyawa 2 adalah : (+)-7-[(6,7-dihidroksi-3,7-

dimetil-2-okten il)-oksi]-kumarin atau marmin. Struktur molekul marmin dilukiskan pada gambar 4. Uji antimikroba menunjukkan bahwa ke dua senyawa tersebut tidak menghambat pertumbuhan mikroba uji. Sedangkan ekstrak kloroform menghambat lemah

pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus cereus*, yaitu memberikan diameter daerah inhibisi 6,5 cm. Uji sitotoksik memberikan IC_{50} lupeol $> 3 \mu\text{g/ml}$ dan IC_{50} marmin $> 10 \mu\text{g/ml}$. Hal ini menunjukkan bahwa lupeol dan marmin pada kadar tersebut mampu menghambat pertumbuhan sel kanker *T-lymphoblastic leukemia* hingga 50% dibandingkan dengan kontrol.

KESIMPULAN

Dengan cara pemisahan tersebut di atas maka dapat ditemukan adanya lupeol dan marmin dari korteks *Aegle marmelos*. Kedua senyawa tersebut tidak mempunyai aktivitas antimikroba. Namun lupeol bersifat signifikan sitotoksik terhadap sel kanker *T-lymphoblastic leukemia*, sedangkan marmin berefek lemah.

PUSTAKA ACUAN

- Buckingham J., Macdonald F.M., Bradley H.M., 1994, *Dictionary of Natural Products*, Vol. 4, Chapman & Hall, London, 3698-3787.
- Heyne, K. 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid II, Diterjemahkan oleh Badan Litbang. Kehutanan, Jakarta. 1085-1087.
- Ohashi, K., H. Watanabe, Y. Okumura, T. Uji, I. Kitagawa, 1994. Indonesian Medicinal Plants. XII. Four Isomeric Lignan-Glucosides from the Bark of *Aegle marmelos* (Rutaceae), *Chem. Pharm. Bull.* 42(9) 1924-1926.
- Rashid, M.A., A.I. Gray, P.G. Waterman, 1992. Coumarins from *Phebalium tuberosum* ssp. *megaphyllum* and *Phebalium filifolium*, *Journal of Natural Products*: Vol. 55, No. 7, 851-858.
- Riyanto, S., M.A. Sukari, M.R Rahmani, 2000. Isolasi Senyawa dari Korteks *Aegle marmelos* Menggunakan Pelarut Petroleum Eter. *Majalah Farmasi Indonesia* : Vol.1, No.11, 17-24.
- Wilzer, K.A., F.R. Fronczek, L.E. Urbatsch, N.H. Fischer, 1989. Coumarins from *Aster prealtus*, *Phytochemistry*: No. 6, Vol. 28, 1729-1735.